

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br><b>C12Q 1/68, C12N 15/10</b>  |  | A1   | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/53099</b><br>(43) Date de publication internationale: 26 novembre 1998 (26.11.98) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01008<br>(22) Date de dépôt international: 20 mai 1998 (20.05.98)<br><br>(30) Données relatives à la priorité:<br>97/06102 20 mai 1997 (20.05.97) FR  |  | (81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br>Publiée<br><i>Avec rapport de recherche internationale.<br/>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i> |   |
| (71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): GENO-LIFE [FR/FR]; Biopôle Clermont-Limagne, Saint-Beauzire, F-63360 Gerzat (FR).<br><br>(72) Inventeurs; et<br>(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): CHAUBRON, Franck [FR/FR]; 61, rue des Gravouses, F-63400 Chamalières (FR). PROVOT, Christian [FR/FR]; Genolife, Biopôle Clermont-Limagne, Saint-Beauzire, F-63360 Gerzat (FR).<br><br>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régime-beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).   |  |  |   |
| (54) Title: METHOD FOR DETECTING QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ALTERATIONS IN DNA AND LIGANDS OF SAID ALTERATION LIGANDS<br><br>(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE D'ALTERATIONS DE L'ADN ET DES LIGANDS DE CES ALTERATIONS   |  |  |   |
| (57) Abstract<br><br>The invention concerns a method for demonstrating an alteration in a DNA sequence, characterised in that: a) said DNA sequence is brought in the presence of a composition comprising at least a compound identifying the type of alteration concerned, called ligand, in a medium ensuring the identification; b) revealing the identification of the alteration by said ligand. The invention is useful for demonstrating the genotoxic properties of a medium by measuring the alteration produced by the medium on the DNA sample, and for demonstrating an alteration of the DNA repair system.  |  |  |   |
| (57) Abrégé<br><br>La présente invention concerne un procédé de mise en évidence d'une altération d'une séquence d'ADN, caractérisé en ce que: a) on met ladite séquence d'ADN en présence d'une composition comportant au moins un composé reconnaissant le type d'altération en cause, dénommé ligand, dans un milieu assurant la reconnaissance, b) on révèle la reconnaissance de l'altération par ledit ligand. Application à la mise en évidence des propriétés génotoxiques d'un environnement par mesure de l'altération que l'environnement produit sur l'ADN de l'échantillon, ainsi que la mise en évidence d'une altération du système de réparation de l'ADN. |  |  |   |

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïjan                | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | IU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroon                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                    | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

**PROCEDE DE DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE  
D'ALTERATIONS DE L'ADN ET DES LIGANDS DE CES ALTERATIONS**

La présente invention a pour objet un procédé de détection qualitative et quantitative d'altérations sur de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN), ces altérations pouvant être dues au métabolisme de la cellule ou à des agents physiques ou chimiques, endogènes ou exogènes, ainsi qu'un procédé de détection qualitative et quantitative de ligand(s) reconnaissant de l'ADN altéré.

La définition la plus satisfaisante (parmi les nombreuses controversées) de la génotoxicité est une définition générale qui envisage l'apparition d'altérations physiques ou chimiques de l'ADN dues à une action directe de l'agent génotoxique ou d'un métabolite, ainsi que ses conséquences biologiques (Butterworth, 1990, Mutat. Res., 239, 117-132 ; Ashby, 1992, Mechanism of Carcinogenesis in risk identification, Vainio H., Magee P.N., McGregor D.B. & McMichael A.J. (eds) IARC, Lyon, 135-164). Parmi les génotoxiques, de nombreuses molécules ou agents physiques sont susceptibles d'induire l'apparition de mutations, lesquelles sont détectées par différents systèmes bactériens ou eucaryotes. Le système de détection des mutagènes le plus généralement utilisé est celui décrit par B.N. Ames (Ames et al., 1973, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285), complété par le test dit du micronoyau (Mac Grégor et al., 1987, Mutat. Res., 189, 103-112).

Puisque la mutagénèse semble être dans de nombreux cas la conséquence de la présence de lésions (dues en particulier à des agents génotoxiques), de nombreux systèmes capables de détecter et quantifier ces dommages à l'ADN ont été développés. La détection de lésions de l'ADN fait appel à des techniques physico-chimiques comme le post-marquage (Randerath et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6126-6129), l'élution alcaline ou neutre (Kohn et al., 1976, Biochemistry, 15, 4629-4637), des techniques immunologiques (Philips D.H., Chemical-carcinogenesis and mutagenesis, vol. I, 503-546, Springer Verlag, Heidelberg, 1990, Cooper and Grover (eds), ou fait appel aux conséquences d'événements de réparation de ces lésions comme l'essai des Comètes (Singh et al., 1988, Exp. Cell Res., 175, 184-191).

Certains essais utilisent la capacité de réparation des lésions de la cellule dont le mécanisme fait intervenir une étape de synthèse d'ADN *de novo*. Cette étape de polymérisation d'ADN peut être quantifiée en utilisant des nucléotides radio-marqués (Cleaver, 1984, Methods for studying excision-repair of eukariotic DNA damaged by physical and chemical mutagens (Kilbey B.J., Nichols W. & Ramel C., eds) 33-69, Elsevier, Amsterdam). Cet essai a été dénommé UDS (Unscheduled DNA Synthesis) et utilisé pour la détection de génotoxique ou pour l'évaluation des capacités de réparation de cellules. Ce test UDS a été perfectionné dans le sens d'une non utilisation de

marqueur radioactif (Selden et al., 1994, *Mutation Res.*, **315**, 147-167) mais ce perfectionnement est relativisé du fait de l'utilisation de la cytométrie de flux qui allourdit la méthode.

La réparation de l'ADN est majoritairement due au système d'excision des lésions, système qui a été récemment reproduit avec des extraits cellulaires (Wood et al., 1988, Cell, 53, 97-106 ; Sibghat-Ullah et al., 1989, Nucleic Acids Res., 17, 4471-4484). Cet essai utilise des plasmides traité et non traité (contrôle) incubés en présence d'extraits actifs transcriptionnellement (Manley et al., 1983, Meth. Enzymol., 101, 568-582). La réaction de réparation consiste dans l'incision-excision des lésions puis la resynthèse d'un fragment d'ADN. La méthode tire profit de cette étape au cours de laquelle un ou des nucléotides radio-marqués est (sont) incorporé(s). Deux grands mécanismes sont impliqués dans la restauration des dommages de l'ADN : l'excision de nucléotides (NER) et l'excision de bases (BER). Ces 2 mécanismes seront décrits plus loin.

Dans le cas de ce test *in vitro*, la réparation des lésions par NER ne concerne qu'un faible pourcentage des lésions, de l'ordre de 7%.

Ces essais ne sont pas applicables à une large application de criblage ou dans un sens plus large de recherche industrielle pour différentes raisons :

(i) le nombre d'échantillons traitables simultanément (de l'ordre de quelques dizaines) est trop faible, (ii) le temps requis pour l'analyse (environ 2 jours) est relativement long, (iii) l'utilisation de molécules radio-marquées restreint ce test à des laboratoires agréés, (iv) le test est restreint à l'utilisation d'ADN plasmidique hautement purifié (formé en renroulée).

Tenant compte de ces contraintes, un nouvel essai de synthèse réparatrice *in vitro* susceptible de pallier les inconvénients des autres systèmes avait été développé, en autorisant l'analyse simultanée de plus de 100 échantillons en 5 heures, avec un système de détection non radioactif. Cette méthode, autorisant également l'utilisation d'ADN de différentes natures, a fait l'objet d'une demande de brevet français n° 95 03230 du 15 mars 1995 et d'une demande PCT n° PCT/FR 96/00391 du 13 mars 1996, publiée sous le n° WO 96 28571 le 19 septembre 1996.

D'autres techniques assez similaires ont pour objet la détection directe de l'ADN endommagé, mais aucune ne porte sur la détection des systèmes de réparation liés à l'ADN lésé. Par exemple, la détection quantitative des altérations de l'ADN par incorporation de nucléotides marqués radioactivement est décrite dans les demandes de brevet n° WO 96 24688 et WO 96 23895 et dans les articles suivants : Salles B. et al. In vitro eukaryotic DNA excision repair assays; an overview; Biochimie, vol. 77, n° 10, 1995 ; Calsou P. et Salles B. Measurement of Damage-specific DNA incision by

nucleotide excision repair in vitro; Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 202, n° 2, 29 juillet 1994 ; Calsou P. et Salles B. Properties of damage-dependent DNA incision by nucleotide excision repair in human cell-free extracts, Nucleic Acids Research, vol. 22, n° 23, 1994 ; Salles B. et Calsou P. Rapid quantification of DNA repair synthesis in cell extracts, Analytical Biochemistry, vol. 215, 304-306, 1993.

La demande de brevet n° WO 96 24688 concerne notamment l'utilisation d'anticorps anti-ADN modifié et l'article de Salles B. et al. (A Chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments, Analytical Biochemistry, vol. 232, 37-42, 1995) porte sur l'incorporation de DIG-11-dUTP et l'utilisation d'anticorps anti-DIG-11-dUTP pour la détection des lésions.

Parmi les documents de l'art antérieur, aucun ne décrit, ni ne suggère, la présente invention telle que définie ci-dessous.

## 15 Description de l'invention

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de mise en évidence d'une altération d'une séquence d'ADN qui puisse assurer une détection de l'ensemble des altérations de l'ADN grâce à une méthode dont la mise en oeuvre soit relativement simple.

Pour ce faire, la présente invention propose un procédé de mise en évidence d'une altération d'une séquence d'ADN, caractérisé en ce que :

- a) on met ladite séquence d'ADN en présence d'une composition comportant au moins un composé reconnaissant le type d'altération en cause, dénommé ligand, dans un milieu assurant la reconnaissance,
- b) on révèle la reconnaissance de l'altération par ledit ligand.

Par reconnaissance de l'altération par ledit ligand, on entend que l'on détecte la fixation directe ou indirecte du ligand sur l'ADN endommagé. Il peut s'agir d'une fixation indirecte lorsque le ligand fait partie d'un complexe par exemple.

Par altération, on entend tout d'abord les dommages de l'ADN. Ceux-ci peuvent être d'origine physique (par exemple radiation ionisante ou non, thermique) ou chimique. Ces facteurs endommageant l'ADN peuvent être d'origine exogène ou endogène. Les types de lésions générés sur l'ADN peuvent grossièrement être classés en 5 types :

- 35 • les adduits (complexation généralement covalente, mais pouvant faire appel à un autre type de liaison chimique comme la liaison de coordination d'une molécule sur une base de l'ADN),

- les pontages de bases (réalisés par apport d'énergie, le type le plus connu étant retrouvé dans les dimères de bases pyrimidiques formés sous l'action de rayonnement UVC ou UVB),
- la complexation de bases de l'ADN à des protéines (ce type de complexation, le plus souvent covalent, étant également la conséquence d'un apport d'énergie),
- les dommages oxydatifs engendrant des modifications de la structure de l'ADN sous forme de cassures ou délétions de bases, cassures du désoxyribose, cassures de la liaison phosphodiester, etc.),
- les cassures causées par les rayonnements ionisants (comme certains rayonnements radioactifs).

En plus de ces dommages, d'autres altérations de l'ADN peuvent survenir. Lors de la réPLICATION de l'ADN, la polymérase impliquée dans ce processus se doit de synthétiser le nouveau brin en appariant correctement les nouvelles bases au brin matrice selon le modèle A-T, G-C. Un mauvais appariement (« mismatch ») constitue une altération de l'ADN. Ce mésappariement peut être naturel (dû à une erreur statistique de la polymérase) ou être la conséquence d'une drogue qui va perturber l'activité de l'enzyme.

Le procédé selon la présente invention permet de détecter aussi bien les « dommages de l'ADN » que les « mésappariements ».

Face à toutes ces altérations, la cellule possède heureusement un arsenal enzymatique lui permettant de rétablir l'ADN dans sa forme normale. Ces mécanismes sont regroupés sous l'appellation générale de « réparation de l'ADN ». Selon le type d'altération, 5 mécanismes principaux interviennent : l'excision de nucléotides, l'excision de bases, le système de réparation des mésappariements, la réparation des cassures simple brin d'ADN et la réparation des cassures double brin d'ADN.

Ces mécanismes ont en commun de faire appel dans une première étape à une reconnaissance de l'altération. C'est précisément grâce à l'existence de composés, notamment des protéines, intervenant au niveau de la reconnaissance de l'altération, appelées ci-après « ligand », que le procédé selon la présente invention a pu être développé.

C'est pourquoi, dans un mode de mise en oeuvre préféré du procédé selon la présente invention, le ligand révélé sera, de préférence, une protéine de reconnaissance du système de réparation de l'ADN.

Par « système de réparation », on entend désigner aussi bien les systèmes de réparation de l'ADN endommagé que les systèmes de réparation des mésappariements. Enfin, par « protéine de reconnaissance », on entend aussi bien la protéine assurant la reconnaissance primaire de l'altération qu'une protéine impliquée dans cette

reconnaissance, notamment lorsqu'il y a formation d'un complexe (par exemple XP-A, RPA ou TFIIH notamment).

Parmi les protéines en cause, il faut citer :

- les protéines du système NER,
- 5 • les protéines du système BER,
- les protéines de réparation des mésappariements,
- les protéines des systèmes détectant les cassures de l'ADN, qu'il soit double ou simple brin.

Le système de réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair : NER) est le mécanisme reconnaissant le plus large spectre de lésions sur l'ADN, ces lésions étant principalement constituées d'adduits encombrants.

La réparation par NER est classiquement décomposée en 4 étapes : reconnaissance de la lésion (1) ; excision de la lésion (2) ; resynthèse du fragment excisé (3) ; ligation du brin néosynthétisé (4).

15 Le mécanisme de reconnaissance des lésions réparées par NER n'est pas encore clairement défini mais il est par contre clairement établi que la protéine XP-A est impliquée (en association ou non avec la protéine RPA et éventuellement le complexe transcriptionnel TFIIH) dans l'un des premiers stades de reconnaissance.

XP-A est la protéine pour laquelle les patients du groupe A de Xeroderma pigmentosum sont déficients. L'absence d'une protéine de réparation de NER rend ces malades très sensibles aux rayonnements UV qui, selon la longueur d'onde, génèrent sur l'ADN des dommages réparés par NER, la forme XP-A étant la forme la plus sévère.

20 La protéine XP-A est une protéine en doigt de zinc (structure classique de protéines interagissant avec l'ADN) constituée de 273 acides aminés et traduite à partir d'un ARN messager de 1,4 kb (Tanaka K. et al, 1990, *Nature*, 348, 73-76).

XP-A reconnaît (avec une préférence d'un facteur 1000 par rapport à un ADN non lésé) les dommages générés par les UVC (environ 75% de dimères de pyrimidine sous forme cyclobutane, 25% de dimères de pyrimidine sous forme de photoproducts (6-4)). Seuls ces types de lésions ont été analysés dans cette étude (Robins P. et al., 1990, *EMBO J.*, 10, 3913-3921). Ces auteurs ont également générés des anticorps polyclonaux contre 2 peptides synthétiques de la protéine XP-A et déterminé que la protéine XP-A ne nécessite pas de phosphorylation pour être active.

En utilisant des colonnes de chromatographie constituées soit d'agarose couplé à de l'ADN simple brin ou de la cellulose couplée à de l'ADN irradié aux UVC, 35 ou en incubant différents types d'ADN (simple ou double brin, lésé aux UVC ou non) Eker et al. concluent que la protéine XP-A extraite de thymus de veau ou de cellule HeLa présente une affinité plus forte pour l'ADN simple brin que pour l'ADN double

brin, mais pas de préférence pour l'ADN lésé aux UVC (Eker et al., 1992, Mutation Res., DNA, 274, 211-224). Ces auteurs ont également générés des anticorps polyclonaux contre la protéine XP-A recombinante.

Les résultats obtenus par Tanaka et al. ont été complétés en 1993 à l'aide d'une protéine XP-A recombinante. Il a été confirmé que XP-A reconnaît bien les lésions UVC et principalement les photoproducts (6-4), ainsi que les lésions dues à l'agent antitumoral cis-platine (*cis*-diamine-dichloroplatinum (II)). Un fragment d'ADN simple brin est 4 fois plus efficace dans une compétition envers un ADN lésé aux UVC vis-à-vis de XP-A qu'un ADN double brin. Par contre, ces auteurs n'ont pas pu mettre en évidence d'affinité de XPA vis-à-vis d'un ADN contenant des adduits issus de psoralène photoactivé (Jones C.J. & Wood R.D., 1993, Biochemistry, 32, 12096-12104).

A la reconnaissance des lésions dues aux UVC ainsi qu'à celles dues au *cis*-platine, Asahina et al. ont ajouté en 1994 les lésions dues au tétr oxyde d'osmium (Asahina H. et al., 1994, Mutation Res., DNA Repair, 315, 229-237).

Le clonage des gènes codant pour XP-A chez le poulet, le xénope et la drosophile (chez laquelle il a été appelé *Dxpa*) montre une forte conservation de ce gène de l'évolution chez les eucaryotes (T. Shimamoto et al., 1995, J. Biol. Chem., 270, 22452-22459).

L'excision de bases apparaît normale dans les cellules XP (Cleaver J.E. & Kraemer K.H., 1989, The metabolic basis of inherited disease, ed. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. & Valle D. (McGraw-Hill, New York), 6<sup>th</sup> Ed., 2949-2971), ce qui confère à XP-A la spécificité de reconnaissance des lésions réparées par NER. Toutefois, en utilisant des ADN lésés par un rayonnement  $\gamma$  ou par les radicaux hydroxyles générés par décomposition de l'eau oxygénée, traités de façon à ce qu'ils ne soient plus reconnus par le système de réparation par excision de bases, Satoh et al. montrent l'implication de XP-A (ainsi que XP-B et XP-C, deux autres sous-groupes de Xeroderma pigmentosum qui en compte sept nommés XP-A à XP-G), dans la réparation de certaines classes de lésions induites par des radicaux libres oxygénés (Satoh M.S. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6335-6339). Le type de substrat utilisé pour mettre en évidence l'implication de protéines du groupe XP dans ce processus de réparation étant totalement artificiel, ces résultats doivent être pris avec précaution.

Enfin, il a été montré par la technique du double hybride ou par des techniques immunologiques plus classiques que la protéine XP-A (recombinante) se liait à la protéine RPA (Replication Protein A, également appelée Human Single-Stranded DNA Binding protein, HSSB). Il n'a toutefois pas été montré dans ces expériences que

cette association était impliquée dans la réparation par excision de nucléotides (Matsuda T., 1995, J. Biol. Chem., 270, 21800-21805).

Il faut ajouter le rôle potentiel des protéines HMG (High Mobility Group). Ces protéines interviennent lors de lésions provoquées par le cis-platine, agent utilisé en chimiothérapie (Hughes et al., 1992, J. Biol. Chem. 267, 13520-13527). Quatre protéines HeLaS3 spécifiques des adduits provoqués par le cis-platine ont été mises en évidence (Donahue et al., 1990, Biochemistry, 29, 587-5880 ; Andrews et Jones, 1991, Cancer Comm. 3, 1-10 ; Hughes et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 13520-13527). Le séquençage de la partie N terminale de deux de ces protéines a révélé une forte homologie avec les protéines HMG2 et HMG1. De même, la liaison covalente de sel de chrome sur l'ADN induit des adduits reconnues par HMG1 et HMG2 *in vivo*. L'affinité des HMG est dose/dépendante vis-à-vis du sel de chrome (Wang et al., 1997, Carcinogenesis, 18, 371-375).

Cependant, leur rôle exact dans la réparation de l'ADN n'a pas encore été établi (pas de reconnaissance en particulier de lésions provoquées par les UV).

Dans la mise en oeuvre du procédé selon la présente invention, on utilisera de préférence la révélation de la protéine XP-A ou des protéines apparentées ainsi qu'éventuellement les protéines RPA, TFIIH et HMG ou d'autres protéines du complexe.

Selon la nature du ligand détecté, on pourra, en outre, envisager de mieux définir le type de génotoxique en cause. En effet, XP-A reconnaît des adduits volumineux et correspond à de nombreux génotoxiques mais ne reconnaît pas des adduits non volumineux et des liaisons oxydatives.

La réparation par excision de bases (BER) est moins bien connue que la réparation par excision de nucléotides (NER). La raison principale réside dans l'absence de mutants pouvant servir à la recherche de gènes impliqués dans ce mécanisme puisqu'il n'existe pas de maladie identifiée comme résultant d'un déficit en BER.

La réparation par excision de bases intervient sur les bases de l'ADN lésées par des espèces réactives oxygénées endogènes, des radiations ionisantes et des agents alkylants. Pour simplifier, le BER intervient sur des dommages peu volumineux au contraire du NER qui reconnaît les dommages volumineux.

Les enzymes clés du BER sont les glycosylases qui enlèvent les bases modifiées par clivage de la liaison N-glycosidique entre la base et le désoxyribose. Il existe différentes glycosylases reconnaissant différents types de dommages. A ce jour, on a identifié une dizaine de ces enzymes chez *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme (Seeberg et al., 1995, TIBS, 20, 391-397).

Une fois la base enlevée, le site AP (apurinique ou apirimidique) est excisé par une AP-endonucléase ou une AP-lyase qui clivent le brin d'ADN respectivement du côté 5' ou 3' du site AP. Le désoxyribose-phosphate restant est excisé par une phosphodiesterase et la resynthèse du brin d'ADN est restaurée par une DNA polymérase. La continuité du brin est ensuite restaurée par une DNA ligase.

Il a été longtemps admis que c'était la polymérase  $\beta$  qui était impliquée dans la resynthèse du brin d'ADN dans le BER. Or, il a été récemment montré sur des extraits cellulaires d'hamster (CHO) que 2 mécanismes différents pouvaient réparer des petits adduits dus à des alkylants. L'un implique la polymérase  $\beta$ , l'autre présente certaines similitudes avec le NER puisque faisant intervenir le PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen ; facteur intervenant dans le NER) (Frosina et al., 1996, J. Biol. Chem., 271, 9573-9578). Les dommages à l'ADN dus aux UVA sont vraisemblablement réparés par BER. En effet, des cellules d'une lignée XP-D ne montrent pas de différence de comportement, par rapport à une lignée sauvage, en terme de courbe de survie suite à une irradiation UVA (320-410 nm) dont les dommages sont de type oxydatif, donc réparés par BER, alors qu'elles sont hypersensibles aux UVB (307-312 nm) et UVC (254 nm) (Stary et al., 1997, Mutation Res., 383, 1-8).

La poly(ADP-ribose) polymérase, ou PARP, impliquée dans la réparation des cassures simple brin est également impliquée dans l'étape finale de ligation de la réparation par BER (Kubota et al., 1996, EMBO J. 15, 6662-6670).

Les mésappariements de bases peuvent survenir au cours de la réPLICATION, la recombinaison ou suite à des dommages sur l'ADN.

Le mécanisme de réparation des mésappariements est bien connu chez la bactérie *E. coli*. Le système MutHLS a ainsi été reconstitué *in vitro* : il est composé des protéines MutH, MutL, MutS et UvrD (ou hélicase II). Le mécanisme est complété par la DNA polymérase III, la DNA ligase et la SSB (Single-Stranded DNA Binding protein) et une exonucléase spécifique de simple brin (Exo I, Exo VII ou la protéine RecJ (Friedberg et al., 1995, DNA repair and Mutagenesis, ASM Press).

La protéine MutS reconnaît le mésappariement et MutH est une endonucléase. Aucune activité n'a pour l'instant été attribuée à MutL, bien qu'elle interagisse avec MutS et soit nécessaire à l'activation de MutH.

Plusieurs données semblent montrer qu'il existe chez l'homme l'homologue du système MutHLS, en particulier la purification d'homologues à MutL (appelé hMLH1) et MutS (appelé hMSH2). hMSH2 reconnaît à la fois les mésappariements de simple base (comme MutS) mais également des mésappariements plus complexes dus à de multiples délétions/insertions (Fishei et al., 1994, Science, 266, 1403-1405 ; Alani et

al., 1995, *Genes Dev.*, 9, 234-247). Il a de plus été montré récemment que hMSH2 peut être copurifié avec une protéine de 160 kD, appelée GTBP (G/T Binding Protein) (Drummond et al., 1995, *Science*, 268, 1909-1912 ; Palombo et al., 1995, *Science*, 268, 1912-1914), mais le rôle de cette GTBP n'est pas clairement élucidé. De la même façon, hMLH1 semble être associée à une autre protéine, hPMS2, et former un hétérodimère appelé hmutL $\alpha$  (Li & Modrich, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1950-1954).

Une déficience dans ce mécanisme de réparation des mésappariements est clairement corrélée à une prédisposition à des cancers, en particulier au cancer du colon non polypeux héréditaire (HNPCC). C'est le cas lors de mutations de hMSH2 (Fishel et al., 1993, *Cell*, 75, 1027-1038 ; Leach et al., 1993, *Cell*, 75, 1215-1225) ou de hMLH1 (Bronner et al., 1994, *Nature*, 368, 258-261 ; Papadopoulos et al., 1994, *Science*, 263, 1625-1629).

Les protéines Mut, notamment MutS ou HMSH2, constituent les cibles de choix pour la mise en oeuvre du procédé selon la présente invention.

L'intérêt de la recherche de ce type de ligand réside dans la caractérisation d'extraits cellulaires (biopsie ou directement *in vivo*). En effet, une déficience du système HMSH2 est, en général, associée à un risque accru de développements de cancers.

Les dommages à l'ADN de type cassures simple brin peuvent être induites par des agents alkylants ou des radiations ionisantes. Ces cassures sont immédiatement reconnues dans la cellule par la poly(ADP-ribose) polymérase, ou PARP.

Cette enzyme est présente en très forte quantité (de l'ordre du million de molécules) dans les noyaux des cellules eucaryotes (à l'exception de la levure).

L'étude de la séquence nucléotidique a montré que cette protéine possède 2 domaines, un domaine N-terminal contenant 2 doigts de zinc et se fixant à l'ADN, et un domaine C-terminal à fonction catalytique (Cherney et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8370-8374).

La reconnaissance de la coupure se fait en recouvrant 7-8 nucléotides de chaque côté de la coupure (Gradwohl et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2990-2994).

Lorsqu'elle est fixée sur une coupure simple brin d'ADN, l'activité catalytique de la PARP est activée. La PARP produit du poly(ADP)ribose en employant comme substrat la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

La durée de vie de la chaîne de poly(ADP-ribose) est normalement très courte, de l'ordre de quelques minutes. Il est possible de bloquer la réaction à l'étape d'interaction ADN-PARP en inhibant la synthèse de poly(ADP)ribose à l'aide d'un

analogue structural du NAD, le 3-aminobenzamide (Prigent et al., 1994, Mol. Cell. Biol., 14, 310-317).

PARP ne participe pas à la réparation de l'ADN mais protège la cassure d'endonucléases. Il a en particulier été montré que la PARP n'intervient pas dans le 5 mécanisme NER (Molinette et al., 1993, EMBO J., 12, 2109-2117 ; Aboussekhra et al., 1995, Cell, 80, 859-868).

Si un rôle dans la reconnaissance des cassures simple brin de l'ADN est bien établie pour la PARP, son rôle physiologique est moins clair. Il a été proposé qu'elle pourrait par exemple avoir un rôle dans le déclenchement de l'apoptose, par différentes 10 voies mais en particulier en épuisant le stock cellulaire de NAD. La PARP pourrait protéger la stabilité génomique de la cellule en évitant de trop fréquents événements de recombinaison aux sites de cassures. Elle pourrait également intervenir dans l'ouverture de zones de chromatine en interférant avec les histones (revu par Lindahl et al., 1995, TIBS, 20, 405-411).

15 Les cassures double brin de l'ADN sont créées en particulier par les radiations ionisantes, mais peuvent provenir d'origine endogène comme dans certaines réactions de recombinaison.

20 Une mauvaise réparation ou une absence de réparation de ces lésions peut être très délétère car pouvant engendrer des délétions ou des translocations ayant pour conséquences possibles l'inactivation d'un gène.

Chez les mammifères, 4 groupes de complémentation ont été identifiés pour 25 la réparation des cassures double brin, définissant 4 gènes impliqués dans ce processus (revu par Jackson & Jeggo, 1995, TIBS, 20, 412-415). Parmi ces 4 groupes (IR4-7 ; IR pour Ionizing Radiation), les groupes IR5 et IR7, dont les produits sont XRCC5 et XRCC7 (X-ray Repair Cross-Complementing), nous intéressent plus particulièrement.

Les groupes IR5 et IR7 sont déficients dans des constituants de la DNA-PK. La DNA-PK (DNA-dependent protein Kinase) est une kinase sérine/thréonine qui 30 n'est active que lorsqu'elle est liée à l'ADN (on peut au passage noter la similitude avec la PARP) (Getts & Stamato, 1994, J. Biol. Chem., 269, 15981-15984 ; Rathmell & Chu, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7623-7627 ; Taccioli et al., 1994, Science, 265, 1442-1445). La DNA-PK est constituée d'une sous-unité catalytique (DNA-PK<sub>cs</sub>) et d'une sous-unité interagissant avec l'ADN appelé Ku.

Ku, à l'origine identifié comme autoantigène est un hétérodimère constitué 35 de 2 polypeptides de 70 et 80 kDa (Ku70 et Ku80) et correspond à XRCC5. Il se fixe aux extrémités d'ADN mais pas à l'ADN cellulaire (Gottlieb & Jackson, 1993, Cell 72, 131-142) et active ainsi la sous-unité DNA-PK<sub>cs</sub>.

Mis à part l'inactivation par phosphorylation de la RNA polymérase I au voisinage de cassures d'ADN (Kuhn et al., 1995, Genes Dev., 9, 193-203), les substrats de la DNA-PKcs. (codée par XRCC7) ne sont pas encore bien définis et son rôle dans la réparation de l'ADN reste à prouver.

5 Le ligand Ku utilisé pour la mise en oeuvre des cassures double brin est plus particulièrement utilisable pour la mise en évidence des rayonnements ionisants (centrales nucléaires ou hôpitaux par exemple).

10 Comme il vient d'être décrit, si les mécanismes de réparation de l'ADN ne sont pas toujours connus en détail, on sait que les altérations de l'ADN sont tout d'abord reconnues par des ligands bien précis ou protéines de reconnaissance, cette reconnaissance précédant l'étape de réparation ayant pour but de reconstituer l'ADN dans sa forme propre. Il est intéressant de noter, par exemple, que si dans le cas de la 15 réparation par NER, seulement 7% des lésions sont réparées *in vitro*, la majorité des lésions, sinon la totalité, sont reconnues puisqu'elles induisent toutes une déformation de l'ADN et que c'est l'étape de réparation proprement dite qui est limitante.

C'est pourquoi le procédé selon l'invention met en oeuvre la constatation que dans un système *in vitro* l'essentiel des altérations, même si elles ne sont pas réparées, sont néanmoins reconnues et que c'est cette étape de reconnaissance qui doit être utilisée pour la mise en évidence des altérations.

20 Le procédé selon l'invention repose donc sur la détection de l'interaction d'une ou des molécule(s) des systèmes de réparation reconnaissant les altérations de l'ADN, en particulier les protéines.

25 Le procédé selon la présente invention est d'abord un procédé qualitatif, c'est-à-dire qu'il permet de détecter l'existence d'une altération de l'ADN et sa nature en fonction précisément du type de ligand. Ainsi, la mise en évidence d'une interaction de XP-A avec l'ADN montre une altération faisant intervenir NER, au contraire l'interaction de MutS ou HMSH2 démontre un problème de mésappariement. Ce type de test permet notamment de définir la génotoxicité d'un environnement et la nature de l'action sur l'ADN.

30 Mais, il peut être quantitatif si la quantité de ligand fixé peut être quantifiée, par exemple par rapport à des standards. Dans ce dernier cas on pourra ainsi évaluer l'importance de l'altération ou suivre les évolutions de celle-ci. Dans ce cas notamment, on pourra classer par exemple les génotoxiques en fonction de leur génotoxicité, mais également suivre l'évolution d'une altération dans le temps par exemple pour 35 « monitorer » un traitement.

Dans les tests décrits précédemment, le produit testé est un ADN altéré par un génotoxique dont on veut évaluer l'activité. On peut également utiliser le procédé

selon l'invention pour, à partir en quelque sorte d'une « altération déterminée d'ADN connue », mesurer l'activité d'un système de réparation.

En particulier, on peut prévoir la mise en évidence d'une déficience de certains systèmes de réparation.

5 En effet, dans le procédé selon la présente invention, afin d'assurer les conditions de la reconnaissance, il est nécessaire de prévoir, outre le ligand, la présence dans le milieu d'autres éléments assurant la reconnaissance, co-facteurs notamment ; pour ce faire, on utilisera en général un extrait cellulaire qui pourra apporter le ligand ou non (dans ce cas le ligand sera ajouté).

10 Lorsque l'on souhaitera tester une éventuelle déficience d'un système de réparation de certaines cellules (prélèvements biologiques par exemple) on pourra utiliser un extrait de ces cellules pour le tester directement sur un ADN altéré, l'activité de reconnaissance des altérations pouvant être évaluée par un standard réalisé, par exemple, avec un extrait cellulaire normal.

15 C'est pourquoi, la présente invention concerne également un procédé permettant la mise en évidence dans un échantillon d'une altération du système de réparation de l'ADN, caractérisé en ce que :

- a) on met l'échantillon en présence d'un ADN altéré,
- b) on révèle la reconnaissance de l'altération par un ligand du système de réparation,
- c) on évalue le résultat obtenu à l'étape b) par rapport à un standard.

On conçoit que l'ensemble des développements effectués sur le procédé principal sont également utilisables dans le procédé décrit précédemment.

Le standard pourra être, par exemple, un échantillon normal traité dans des conditions équivalentes ou toute autre méthode, notamment des courbes d'étalonnage.

25 Par « altération du système de réparation » on entend désigner toute modification de la réponse dans le test précédent d'un système de réparation par rapport à un système témoin servant de standard. Cette altération sera caractérisée en général par une déficience de la reconnaissance de l'ADN altéré, mais le contraire est également possible.

30 Ainsi, le procédé selon l'invention pourra permettre de mettre en évidence la présence ou l'absence de protéines en relation par exemple avec une pathologie déterminée. Une telle application peut être mise à profit pour évaluer la résistance acquise à certains agents alkylants utilisés en traitement antitumoral chez des patients et ceci par mesure d'un défaut de réparation des mésappariements (Eshleman & 35 Markowitz, 1995, Curr. Opin. Oncol. 7, 83-89) ou la sensibilité ou résistance à la radiothérapie.

De plus, ce même procédé selon l'invention permet de mettre en évidence des altérations dans les modulateurs de reconnaissance de ligands d'ADN (comme des agents antitumoraux interagissant avec des facteurs de réparation).

En effet, dans ce cas, on notera des modifications dans la réponse des 5 ligands de reconnaissance.

La mise en oeuvre spécifique du procédé selon la présente invention peut être réalisée selon différentes variantes.

Le procédé selon la présente invention peut être mis en oeuvre selon différentes variantes.

10 L'ADN testé peut être un extrait cellulaire total, un extrait cellulaire semi-purifié ou bien un ADN purifié, ceci dépendra du type de recherche effectuée.

15 Le milieu de reconnaissance pourra être entièrement synthétique ou bien être constitué par un extrait cellulaire, lequel pourra notamment comporter également le ligand, dans ce cas la révélation sera effectuée avec un marqueur de la fixation du ligand, anticorps marqué par exemple. En tout état de cause, le milieu de reconnaissance devra comporter tous les cofacteurs nécessaires à la reconnaissance de l'altération.

20 De façon préférentielle, le milieu de reconnaissance est constitué d'un extrait cellulaire plus ou moins purifié quant à la présence de ligand endogène et d'ADN endogène audit milieu de reconnaissance.

L'interaction du ligand et de l'ADN pourra être mise en évidence par toute méthode appropriée, en particulier comme cela a été précisé, à l'aide d'un ligand marqué ou à l'aide d'un anticorps reconnaissant le ligand.

25 Dans tous les cas, le marquage pourra être radioactif ou non. On préférera l'utilisation de marquages non radioactifs, c'est-à-dire fluorescents par exemple, ou de marquages enzymatiques.

30 En particulier, il est possible de prévoir que l'étape a) comporte des composés reconnaissant différents types d'altération et en ce que dans l'étape b) on puisse identifier séparément les différents types de reconnaissance. Dans le cas de marqueurs fluorescents, on pourra ainsi utiliser des chromophores différents. Ceci permet de visualiser immédiatement le type d'altération ou même les diverses altérations.

De façon plus spécifique, le procédé comprend les étapes suivantes :

- l'action, dans le cas de l'utilisation d'un ADN cible, de l'agent (physique ou chimique) à tester sur cet ADN ; dans le cas d'un agent chimique, l'action du composé peut nécessiter l'action concomitante d'un mélange activateur des

composés (comme par exemple l'action biotransformante d'un extrait hépatique de type « S9 » en présence de tous les cofacteurs nécessaires) ;

- la purification d'ADN de cellules ou tissus dont on veut connaître le degré d'altération de l'ADN (par exemple suivi de malades ou personnes en contact avec des environnements à risque, incubation de cellules en culture avec des agents dont la génotoxicité est à déterminer ; recherche de corrélation entre l'état d'altération de l'ADN cellulaire et la présence ou prédisposition à certaines maladies par exemple) ;
- l'action d'un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice, ou au minimum de reconnaissance des altérations, sur cet ADN, ou plus simplement d'une protéine, ou complexe protéique, reconnaissant ces altérations ou un extrait déficient en une protéine que l'on ajoutera ;
- la révélation de l'interaction d'une protéine ou complexe protéique à l'aide d'un anticorps ; plus simplement, dans le cas d'une protéine purifiée reconnaissant les lésions, il est possible de greffer directement sur cette protéine un marqueur de révélation direct (de type fluorescence par exemple) ou indirect (de type enzymatique), ces exemples n'étant pas limitatifs ;
- dans le cas de l'utilisation d'un anticorps, sa révélation directe ou indirecte (anticorps directement marqué) ou révélation par un anticorps (ou ligand) secondaire ;
- détection choisie de préférence parmi les techniques sensibles telles que la luminescence (substrat luminescent) ou la fluorescence, éventuellement la radioactivité.

L'ensemble de ces étapes peut se faire en phase liquide ou en phase semi-solide en fixant l'un des réactifs sur un support (plaquette de microtitration, membrane ou microbille, gel ou colonne d'agarose ou colonne d'affinité par exemple) ; dans le premier cas, on choisirra préférentiellement un système ne nécessitant pas de lavages entre les différentes étapes ou un système en une seule étape ; dans le second cas, les différentes étapes sont séparées par des lavages.

Dans le cas d'un dosage avec une phase solide ou semi-solide, la nature du réactif fixé, ligand ou ADN notamment, pourra dépendre du type de dosage effectué, dosage de l'importance de la lésion ou bien dosage de la reconnaissance.

Dans le cas d'un dosage en phase liquide, il est nécessaire de pouvoir mettre en évidence la fixation du ligand sur l'ADN, on peut notamment prévoir deux marquages différents pour l'ADN et le ligand et évaluer visuellement la proximité des marqueurs, on peut également utiliser des systèmes type TRACE dans lesquels l'un des marqueurs ne peut être révélé que par la proximité du second. De façon générale, le test consiste à incuber l'ADN (lésé ou non) à la fois en présence d'un anticorps anti-ADN et

d'une protéine spécifique d'altérations de l'ADN. Ladite protéine peut être couplée directement à un fluorophore ou être révélée par un anticorps. Dans le cas de l'utilisation d'un anticorps anti-ADN et d'une protéine spécifique, chacun des deux ligands peut être couplé à un fluorophore dont les longueurs d'onde d'émission diffèrent suffisamment pour être lues simultanément avec une bonne discrimination. On peut également, dans les deux cas de figure envisagés ci-dessus, utiliser un système de détection TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission) décrit par CIS bio international (Bagnols-sur-Sèze, France). On pourrait, dans ce cas, conjuguer l'anticorps anti-ADN au « cryptate » (trisbipyridine diamine Europium) et lier une protéine de reconnaissance des lésions ou l'anticorps la reconnaissant, à un fluorophore accepteur d'énergie tel que la phycobiliprotéine modifiée, appelée par CIS Bio International XL665 (ou l'inverse), ou marquer 2 protéines qui ne forment un complexe qu'au voisinage de l'ADN altéré. On peut envisager de standardiser la lecture en rapportant le signal à la quantité d'ADN. Cette quantité d'ADN (relative) peut être obtenue à l'aide du même système en utilisant par exemple deux anticorps anti-ADN, l'un couplé au cryptate, l'autre au fluorophore accepteur d'énergie.

L'avantage du système TRACE porte sur sa rapidité (puisque il n'est pas nécessaire de procéder à des étapes de lavage), mais surtout sur la quantité d'ADN (et donc de lésions) analysable par condition. De plus, ce système est tout à fait automatisable, et est d'ailleurs déjà adapté au criblage HTS.

Si l'on ne dispose pas du ligand d'altération purifié, ou si celui-ci nécessite des cofacteurs, protéiques ou non, pour l'étape d'interaction, on peut dans ce cas utiliser un extrait cellulaire purifié de manière à ce que ces cofacteurs soient présents. Dans ce cas, l'interaction du ligand avec l'altération sera mise en évidence à l'aide d'un anticorps dirigé contre ce ligand. Cet anticorps peut être couplé à un système permettant de le détecter, ou on fait appel à une méthode connue de l'homme de l'art consistant à utiliser un second anticorps dirigé contre le premier, ce second anticorps étant couplé à un système de détection.

Dans le dosage en phase solide, on pourra fixer l'ADN endommagé sur un support et révéler la fixation d'un ligand sur l'ADN fixé par exemple, d'autres méthodes sont envisageables qui dérivent des méthodes décrites précédemment pour la phase liquide.

Il est possible également d'utiliser des systèmes de dosage de type « biochips », notamment les techniques développées par Affymetrix ou CIS Bio International (Bagnols-sur-Sèze, France).

On peut envisager de fixer l'ADN sur les chips :

- Un oligonucléotide ou ADN contenant un mésappariement peut permettre de détecter la présence de hMSH2 dans une biopsie ou *in vivo* et donc le risque de développement d'un cancer. Cette méthode doit être quantitative pour discriminer 5 les individus sains homozygotes des hétérozygotes pour le gène hMSH2, prédisposés au développement de cancers, en particulier du côlon.
- Un oligonucléotide ou ADN contenant un adduit d'un génotoxique utilisé en chimiothérapie (alkylant, cis-platine, etc.) pourrait servir à un suivi du taux de protéines XPA et au suivi d'un certain type de résistance.

10 On peut également prévoir la fixation de la protéine sur les chips :

- Il n'est plus question d'utiliser des anticorps anti-protéines mais les protéines elles-mêmes. On peut en théorie, à partir de ce système, détecter tous les types de lésion et la quantification de l'ADN se ferait en utilisant un anticorps anti-ADN qui permettrait de rapporter le signal obtenu pour chaque type de lésion à un signal 15 « ADN ». Ce système semble assez intéressant pour le suivi thérapeutique.

Comme cela a été décrit dans le préambule, le procédé selon la présente invention est plus particulièrement utilisable pour évaluer la génotoxicité d'un environnement sur un échantillon par mesure de l'altération de l'ADN dudit échantillon.

20 Par « environnement », on entend désigner aussi bien des facteurs chimiques, biologiques que physiques (rayonnement par exemple).

L'invention est notamment applicable à l'évaluation qualitative et quantitative de lésions sur l'ADN de cellules cultivées *in vitro*, isolées *ex vivo* ou issues 25 de tissus animaux ou végétaux, par exemple application à la détection de xénobiotiques génotoxiques, au suivi thérapeutique de patients atteints de tumeurs soumis à un traitement chimiothérapeutique, application au suivi des risques de personnes en contact avec des agents potentiellement génotoxiques.

30 On peut également l'utiliser, en général, à l'évaluation qualitative et quantitative de composés réagissant avec des molécules nucléophiles (ADN, composés lipidiques, etc.) tels que les radicaux libres, notamment dans le domaine des cosmétiques par exemple, de même que dans l'évaluation qualitative et quantitative de composés inhibant l'action d'agents oxydants.

35 Enfin, le procédé permet la détermination des capacités d'un extrait cellulaire à reconnaître des lésions ainsi que la détermination du type de lésions induites sur l'ADN grâce à l'utilisation, soit d'extraits cellulaires déficients dans une partie du système de réparation de ces lésions, soit de protéines spécifiques, soit d'anticorps dirigés contre des protéines spécifiques.

Le présent procédé, basé sur la mise en évidence d'une interaction spécifique de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN lésé, présente un grand nombre d'avantages :

- ce test est, dans le cas d'un support solide, un simple ELISA, et comme tel 5 automatisable et adapté au « high throughput screening » ou HTS,
- ce test est d'autant plus automatisable dans son option totalement phase liquide,
- par rapport notamment au test décrit dans le brevet français n° 95 03230 du 15 mars 10 1995, publié le 20 septembre 1996 sous le n° 2 731 711 ; demande PCT/FR 96/00391 du 13 mars 1996, en référence le 19 septembre 1996 sous le n° WO 96 28571, celui-ci est avantageux car
  - il nécessite moins d'extraits cellulaires ou
  - il ne nécessite pas d'extraits cellulaires, une (ou une combinaison de) 15 protéine(s) purifiée(s) ou même produite(s) par génie génétique étant suffisante,
  - il ne nécessite pas de nucléotide modifié, ou marqué, radioactivement par exemple,
  - il ne nécessite pas d'adsorption de l'ADN sur un support sensibilisé, mais la fixation de l'ADN cible peut, par exemple, se faire par une extrémité (exemple : ADN biotinylé, support couplé à un ligand de biotine, tel que la 20 streptavidine) ;
  - il est plus rapide (puisque il ne s'intéresse qu'à l'étape de reconnaissance de la lésion et non pas à l'ensemble reconnaissance-réparation), ce qui peut réduire le test à un temps de l'ordre de 2 à 3 heures ;
  - si on utilise une protéine du NER il est possible d'incuber l'ADN cible en présence 25 d'un système activateur : différentes sources de fractions activatrices pouvant être utilisées :
    - fraction S9 ou microsomale, de foie de rat ou de cobaye, induit ou non,
    - extrait de cellules humaines HepG2 stimulées, ou non, à l'hydrocortisone 21 hémisuccinate et au benzanthracène,
    - extrait de cellules de la lignée humaine MCL 5 (société Gentest),
    - extrait de cellules eucaryotes recombinantes exprimant des P450,
    - catalyse par les porphyrines.

Dans le cas de l'utilisation d'une seule protéine de reconnaissance (porteuse ou non d'un marqueur), la protéine XP-A sera préférentiellement utilisée car elle est la 30 première à reconnaître une lésion de l'ADN. De plus, cette protéine, dont l'ADN complémentaire est cloné, peut être exprimée dans un vecteur propagé dans un

microorganisme et ainsi être produite en grande quantité dans un fermenteur par exemple.

On peut également co-incuber la protéine XP-A et le complexe RPA.

On peut également envisager d'utiliser de la même façon uniquement XPA  
5 ou le complexe RPA.

On peut également envisager d'utiliser de la même façon les protéines HMG.

De façon générale, les systèmes les plus intéressants selon la présente invention sont les systèmes NER et BER.

10 Pour la suite de la description, on se référera aux légendes des figures.

### Légendes

#### **Figure 1 : Principe du test GeneTEX (Gene Toxicology Environment Xenobiotics)**

Le test GeneTEX comporte 6 étapes :

- 1- Adsorption de l'ADN cible sur un support,
- 15 2- génération de lésions par incubation avec un agent génotoxique,
- 3- reconnaissance de lésions par une protéine issue d'un extrait cellulaire,
- 4- révélation de la fixation de cette protéine par un anticorps,
- 5- révélation de la fixation du premier anticorps par un anti-anticorps couplé à un enzyme,
- 20 6- génération d'un signal lumineux par addition d'un substrat chimiluminescent de l'enzyme.

L'ADN est représenté par une double hélice, les lésions par des cercles noirs, les protéines de reconnaissance des lésions par des ovales blancs, et les anticorps couplés à un enzyme porte un rectangle blanc.

25 **Figure 2 : Reconnaissance de dommages dus aux UVC par la protéine XPA dans un extrait cellulaire et détection par un anticorps monoclonal anti-XPA**

Ce graphe représente le signal obtenu (rapport signal/bruit de fond) en fonction des doses UVC croissantes.

30 **Figure 3 : Reconnaissance de cassures double-brin induites par la bléomycine par la protéine Ku dans un extrait cellulaire et détection par un anticorps monoclonal anti-Ku**

Ce graphe représente le signal obtenu (rapport signal/bruit de fond) en fonction de concentrations croissantes de bléomycine.

35 **Figure 4 : Mesure de la persistance de cassures double-brin radio-induites par la protéine Ku dans un extrait cellulaire et détection par un anticorps monoclonal anti-Ku**

+/+ désigne les cellules non mutées pour le gène ATM

+/- représente les cellules mutés hétérozygotes pour le gène ATM

-/- désigne les cellules mutées homozygotes pour le gène ATM

12h et 24h représentent les temps de post-incubation avec irradiation

1Gy et 3Gy (Gray) définissent les doses d'irradiation

5

**Un mode avantageux de la présente invention est basé sur le principe du test appelé GeneTEX :**

L'ensemble de ce test se déroule préférentiellement à 30°C. Chaque étape 10 est séparée par des lavages.

L'ADN cible est adsorbé sur des puits préalablement recouverts par la polylysine. Cet ADN est soumis pendant la durée désirée, préférentiellement 30 minutes, à l'action d'un agent génotoxique ou d'une composition contenant au moins un tel agent.

Cette étape a pour effet de générer des lésions sur l'ADN, si la solution 15 testée contient un (ou des) agent(s) génotoxique(s).

Un extrait cellulaire, préférentiellement d'origine humaine, préférentiellement issu de cellules HeLa, est incubé sur l'ADN. Les protéines de reconnaissance des altérations de l'ADN vont se fixer aux sites d'altération.

Un anticorps, polyclonal ou préférentiellement monoclonal, dirigé contre la 20 protéine de reconnaissance des altérations est ajouté et va reconnaître les protéines fixées aux sites d'altération.

Un second anticorps, dirigé contre le premier anticorps (reconnaissant préférentiellement l'espèce dont est issu le premier anticorps), couplé à une enzyme, préférentiellement de type peroxydase, est ajouté et va reconnaître le premier anticorps.

25 Un substrat luminescent de l'enzyme est ajouté et le signal lumineux émis est quantifié par un luminomètre.

Un des aspects du test geneTEX est illustré à la figure 1. Toutefois, ce test ne se limite pas à cet aspect et peut comporter les variantes suivantes :

- 1) L'anticorps dirigé contre la protéine de reconnaissance peut être directement couplé 30 à un système de détection, ne nécessitant donc pas d'anticorps secondaire. Ce système de détection peut être une enzyme, un marqueur fluorescent ou un marqueur de fluorescence en temps résolu (de type chélate d'Europium), ou un marqueur d'électrochimiluminescence.
- 2) Des cellules sont incubées en présence de l'agent génotoxique pendant le temps 35 désiré, puis lysées et l'ADN cellulaire adsorbé sur les puits sensibilisés. L'ensemble du test se déroule ensuite normalement.

3) L'ensemble du test peut être réalisé en phase liquide, sans utilisation d'un support solide en utilisant la technologie TRACE développée par Cis Bio International (Bagnols-sur-Sèze, France) qui utilise un transfert d'énergie entre un cryptate d'Europium et un accepteur d'énergie (en particulier la molécule XL665). Il n'y a émission de signal uniquement dans le cas où les 2 molécules, portées par exemple par 2 anticorps, sont suffisamment proches. Dans le cas du test, l'anticorps dirigé contre la protéine de reconnaissance de l'altération est par exemple couplé au cryptate, et un anticorps anti-ADN est couplé au XL665 (ou l'inverse), ou 2 anticorps dirigés contre 2 protéines formant un complexe au voisinage de l'ADN altéré sont utilisés. Les 2 anticorps se trouvant suffisamment proches, le transfert d'énergie entre le cryptate d'Europium excité et l'accepteur XL665 va être possible et le signal fluorescent émis est proportionnel au taux d'anticorps fixé sur la protéine de reconnaissance des altérations.

15 **Exemple 1 : détection de lésions sur l'ADN reconnues par le système NER**

L'ADN (plasmide pUC18), à la concentration de 50µg/ml, a été lésé aux UVC par irradiation sous une lampe éclairant à 254nm à 50µW/cm<sup>2</sup> pendant les temps nécessaires à l'obtention de doses variant de 5 à 200J/m<sup>2</sup>.

20 L'ADN prélevé aux UVC a été adsorbé sur des puits recouverts par de la poly-lysine, à raison de 50ng par puits. En contrôle, des ADN portant des lésions oxydatives (lésions générées par clairement en présence de bleu de méthylène), réparés par le système BER ont été utilisés.

Après une incubation de 30 minutes, les puits ont été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

25 Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Les puits ont ensuite été saturés à l'aide d'une solution de BSA à 3% dans du PBS pendant 1 heure à 30°C, sous agitation.

30 Les puits ont ensuite été lavés 1 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Les puits ont ensuite été incubé avec un extrait cellulaire de type Manley [Manley *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3855-3859], modifié par Wood [Wood *et al.* (1988) Cell, 53, 97-106] pendant 90 minutes à 30°C dans un tampon contenant 40mM Hepes; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM KCl; 0,5mM DTT; 10mM phosphocréatine; 0,1mg/ml BSA; 50µg/ml créatine phosphokinase; 2mM EGTA; pH 7,6.

Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

La fixation de la protéine XPA a été révélé par incubation d'un anticorps monoclonal anti-XPA dilué à 900ng/ml dans du PBS additionné de BSA 0.1% et 5 d'Igepal CA-630 (vendu par Sigma) pendant 2 heures à 30°C, sous agitation.

Les puits ont ensuite été lavés 3 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

10 L'anticorps primaire anti-XPA a ensuite été reconnu par un anticorps secondaire de chèvre, anti-souris, couplé à la peroxydase, dilué au 1/10,000 dans le même tampon que l'anticorps primaire dans une incubation de 30 minutes.

Les puits ont ensuite été lavés 5 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

15 Un substrat luminescent de la peroxydase (Specichrom, vendu par Speci, Ste Foy-les-Lyon, France) est ensuite ajouté et l'ensemble a été incubé pendant 15 minutes à 30°C sous agitation.

Le signal lumineux émis a été mesuré par un Victor (Wallac oy, Turku, Finlande).

Le résultat est exprimé comme le rapport de signal spécifique sur le signal du plasmide non traité et un exemple de résultat est donné sur la figure 2.

20 Il est ainsi montré, à ce stade de développement du test, un seuil de détection de 30J/m<sup>2</sup> pour les lésions UVC.

Les lésions générées par le bleu de méthylène éclairé n'ont pas été détectées.

#### **Exemple 2 : détection de cassures double-brin sur l'ADN**

25 Ce type de cassures, générant une augmentation du nombre de fragments d'ADN et donc d'extrémités, est détecté par le complexe Ku-DNA<sup>PK</sup>. La fixation sur les extrémités est assurée par la sous unité Ku (Ku70-Ku80).

30 En pratique, des cassures double-brin ont été générées par une molécule radiomimétique, la bléomycine, en présence d'ions ferreux: il y a dans ce cas production de cassures double-brins comme dans le cas de traitement par des radiations ionisantes.

L'ADN (plasmide pUC18) a été adsorbé sur des puits recouverts par de la poly-lysine, à raison de 50ng par puits.

Après une incubation de 30 minutes, les puits ont été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

35 Des doses croissantes de bléomycine (de 0 à 200μM) ont été incubées pendant 30 minutes avec l'ADN adsorbé, en présence de 0.5μM de FeCl<sub>2</sub>, sous agitation à 30°C.

Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Les puits ont ensuite été saturés à l'aide d'une solution de BSA à 3% dans du PBS pendant 1 heure à 30°C, sous agitation.

5 Les puits ont ensuite été lavés 1 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

L'ADN traité a ensuite été incubé avec un extrait cellulaire de type Manley [Manley *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3855-3859], modifié par Wood [Wood *et al.* (1988) Cell, 53, 97-106] pendant 90 minutes à 30°C dans un tampon contenant 10 40mM Hepes; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM KCl; 0,5mM DTT; 10mM phosphocréatine; 0,1mg/ml BSA; 50µg/ml créatine phosphokinase; 2mM EGTA; pH 10 7,6.

Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

15 La fixation du complexe Ku a été révélée par incubation d'un anticorps monoclonal anti-Ku dilué à 400ng/ml dans du PBS additionné de BSA 0.1% et d'Igepal CA-630 (vendu par Sigma) pendant 2 heures à 30°C, sous agitation.

Les puits ont ensuite été lavés 3 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

20 L'anticorps primaire anti-Ku a ensuite été reconnu par un anticorps secondaire de chèvre, anti-souris, couplé à la peroxydase, dilué au 1/10,000 dans le même tampon que l'anticorps primaire dans une incubation de 30 minutes.

Les puits ont ensuite été lavés 5 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

25 Un substrat luminescent de la peroxydase (Specichrom, vendu par Speci, Ste Foy-les-Lyon, France) est ensuite ajouté et l'ensemble a été incubé pendant 15 minutes à 30°C sous agitation.

Le signal lumineux émis a été mesuré par un Victor (Wallac oy, Turku, Finlande).

30 Le résultat est exprimé comme le rapport de signal spécifique sur le signal du plasmide non traité et un exemple de résultat est donné sur la figure 3.

Il est ainsi montré, à ce stade de développement du test, un seuil de détection de 0,032µM (32nM) pour les cassures double-brin générées par la bléomycine en présence de 0,5µM de FeCl<sub>2</sub>.

**Exemple 3 : détection de mésappariements de bases de l'ADN**

Ce type d'altération de l'ADN, est détecté par un complexe protéique. La reconnaissance du mésappariement est assurée par la protéine hMSH2.

En pratique, des oligonucléotides 37-mer ont été synthétisés de façon à 5 générer un appariement parfait ou un site de mésappariement (la base introduisant le mésappariement est soulignée).

Les séquences suivantes ( Fishel et al., 1994, Science, 266? 1403-1405) ont été synthétisées :

|    |          |    |   |    |
|----|----------|----|---|----|
| 10 | MIS-C    | 5' | ATGTGAATCAGTATGGTCCTATCTGCTGAAGGAAAT          | 3' |
|    | MIS-T    | 5' | ATGTGAATCAGTATGGTT <u>C</u> TATCTGCTGAAGGAAAT | 3' |
|    | MIS-Grev | 5' | AATTCC <u>T</u> TCAGCAGATAGGAACCATACTGATTACAT | 3' |

15

Les oligonucléotides sont solubilisés à 1mg/ml dans du TE1X.

L'appariement (hybridation) est réalisé dans 200µl, à 400µg/ml de chaque oligo, en présence de NaCl 1M

20 Les tubes sont portés à 100°C pendant 10 minutes dans un thermocycleur et laissés à refroidir pendant 3 heures.

L'ADN est ensuite précipité par addition de 2,5 volume d'éthanol absolu, gardé la nuit à -20°C, puis centrifugé à 14000 rpm à 4°C pendant 40 minutes. Après lavage des culots dans de l'éthanol à 70% et séchage, les culots sont repris par 1,5ml de TE1X (à une concentration finale de 100µg/ml).

25 L'hybridation MIS-C + MIS-Grev conduit à un ADN double-brin normalement apparié (C:G) alors que l'hybridation MIS-C + MIS-T conduit à un ADN double brin comportant un mésappariement (C:T).

L'ADN a été adsorbé sur des puits recouverts par de la poly-lysine, à raison de 200ng par puits.

30 Après une incubation de 30 minutes, les puits ont été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Les puits ont ensuite été saturés à l'aide d'une solution de BSA à 3% dans du PBS pendant 1 heure à 30°C, sous agitation.

35 Les puits ont ensuite été lavés 1 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

L'ADN traité a ensuite été incubé avec un extrait cellulaire de type Manley [Manley *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3855-3859], modifié par Wood

[Wood *et al.* (1988) Cell, 53, 97-106] pendant 90 minutes à 30°C dans un tampon contenant 40mM Hepes; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM KCl; 0,5mM DTT; 10mM phosphocréatine; 0,1mg/ml BSA; 50µg/ml créatine phosphokinase; 2mM EGTA; pH 7,6.

5 Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

La fixation de hMSH2 a été révélée par incubation d'un anticorps monoclonal anti-hMSH2 dilué à 2µg/ml dans du PBS additionné de BSA 0.1% et d'Igepal CA-630 (vendu par Sigma) pendant 2 heures à 30°C, sous agitation.

10 Les puits ont ensuite été lavés 3 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

L'anticorps primaire anti-hMSH2 a ensuite été reconnu par un anticorps secondaire de chèvre, anti-souris, couplé à la peroxydase, dilué au 1/10,000 dans le même tampon que l'anticorps primaire dans une incubation de 30 minutes.

15 Les puits ont ensuite été lavés 5 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Un substrat luminescent de la peroxydase (Specichrom, vendu par Speci, Ste Foy-les-Lyon, France) est ensuite ajouté et l'ensemble a été incubé pendant 15 minutes à 30°C sous agitation.

20 Le signal lumineux émis a été mesuré par un Victor (Wallac oy, Turku, Finlande).

Le rapport de signal spécifique (oligonucléotide portant un mésappariement; T:G) sur le signal de l'oligonucléotide ne portant pas de mésappariement (C:G) a été de 5.

25 **Exemple 4 : application à la mise en évidence de différences de capacité de réparation des cassures double-brin chez des cellules de patients portant ou non un gène muté ATM**

30 Les cellules lymphoblastoides, issues de patients sains, hétérozygotes ou homozygotes pour le gène ATM (Ataxia telangiectasia; conduisant à une hypersensibilité aux radiations ionisantes), en culture ont été irradiées à des doses de 0; 1 et 3 Gy. Les doses de 1 et 3 Gy ont pour effet de générer des cassures double-brin de l'ADN qui vont être détectées par le biais de la reconnaissance du complexe Ku-DNA<sup>PK</sup> comme décrit dans l'exemple 2.

35 Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu adapté pendant 12 et 24 heures, temps auxquels elles sont lavées et congelées à -80°C.

Elles sont ensuite lysées et l'ADN génomique adsorbé sur les puits comme dans les exemples précédents.

Après une incubation de 30 minutes, les puits ont été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

5 Les puits ont ensuite été saturés à l'aide d'une solution de BSA à 3% dans du PBS pendant 1 heure à 30°C, sous agitation.

Les puits ont ensuite été lavés 1 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

10 L'ADN traité a ensuite été incubé avec un extrait cellulaire de type Manley [Manley *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3855-3859], modifié par Wood [Wood *et al.* (1988) Cell, 53, 97-106] pendant 90 minutes à 30°C dans un tampon contenant 40mM Hepes; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM KCl; 0,5mM DTT; 10mM phosphocréatine; 0,1mg/ml BSA; 50µg/ml créatine phosphokinase; 2mM EGTA; pH 7,6.

15 Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

La fixation du complexe Ku a été révélée par incubation d'un anticorps monoclonal anti-Ku dilué à 100ng/ml dans du PBS additionné de BSA 0.1% et d'Igepal CA-630 (vendu par Sigma) pendant 2 heures à 30°C, sous agitation.

20 Les puits ont ensuite été lavés 3 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

L'anticorps primaire anti-Ku a ensuite été reconnu par un anticorps secondaire de chèvre, anti-souris, couplé à la peroxydase, dilué au 1/10,000 dans le même tampon que l'anticorps primaire dans une incubation de 30 minutes.

25 Les puits ont ensuite été lavés 5 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Un substrat luminescent de la peroxydase (Specichrom, vendu par Speci, Ste Foy-les-Lyon, France) est ensuite ajouté et l'ensemble a été incubé pendant 15 minutes à 30°C sous agitation.

30 Le signal lumineux émis a été mesuré par un Victor (Wallac oy, Turku, Finlande).

Le résultat est exprimé comme le rapport de signal spécifique sur le signal du plasmide non traité et un exemple de résultat est donné sur la figure 4.

Il est ainsi montré que le test est en particulier applicable à la mesure de la radiosensibilité de cellules issus de patients. Selon la cinétique de réparation des cassures induites par les radiations ionisantes, on peut discriminer les patients

homozygotes ATM, les hétérozygotes ATM et les patients ne portant pas de mutation dans ce gène.

A la dose de 3Gy, les cassures de l'ADN sont moins bien réparées chez les hétérozygotes pour le gène ATM comme en témoigne le pourcentage de cassures persistantes.

Selon le même principe, il est possible de détecter toute sensibilité aux radiations ionisantes, quelle soit due à un déficit en ATM ou dans un autre gène.

**Exemple 5 : détection de lésions sur l'ADN reconnues par le système NER par un anticorps anti-XPA et la technique DELFIA®**

L'ADN (plasmide pUC18) a été prétréité aux UVC ou au cis-platine comme décrit dans l'exemple 1.

L'ADN prétréité aux UVC ou au cis-platine a été adsorbé sur des puits recouverts par de la poly-lysine, à raison de 50ng par puits. En contrôle, des ADN portant des lésions oxydatives (lésions générées par éclairement en présence de bleu de méthylène), réparés par le système BER ont été utilisés.

Après une incubation de 30 minutes, les puits ont été lavés 2 fois par une solution de PBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de TBS (Tris buffer saline) additionnée de Tween-20 à 0.1%.

Les puits ont ensuite été saturés à l'aide d'une solution de BSA à 3% dans du TBS pendant 1 heure à 30°C, sous agitation.

Les puits ont ensuite été lavés 1 fois par une solution de TBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

L'ADN traité a ensuite été incubé avec un extrait cellulaire de type Manley [Manley *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3855-3859], modifié par Wood [Wood *et al.* (1988) Cell, 53, 97-106] pendant 90 minutes à 30°C dans un tampon contenant 40mM Hepes; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM KCl; 0,5mM DTT; 10mM phosphocréatine; 0,1mg/ml BSA; 50µg/ml créatine phosphokinase; 2mM EGTA; pH 7,6.

Les puits ont ensuite été lavés 2 fois par une solution de TBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

La fixation de la protéine XPA a été révélée par incubation d'un anticorps monoclonal anti-XPA dilué à 500ng/ml dans du TBS additionné de BSA 0.1% et d'Igepal CA-630 (vendu par Sigma) pendant 2 heures à 30°C, sous agitation. Cet anticorps a été au préalable marqué à une moyenne de 10 chélates d'Europtium (Eu<sup>3+</sup>) selon le protocole Wallac.

Les puits ont ensuite été lavés 8 fois par une solution de TBS additionnée de Tween-20 à 0.1%.

La solution de révélation ("Enhancement Solution", Wallac) est ensuite ajoutée (50µl/puits) et la plaque mise à agiter vigoureusement pendant 5 minutes.

- 5 La fluorescence ("Time Resolved Fluorescence") émise a été mesurée par un Victor (Wallac oy, Turku, Finlande) selon le protocole DELFIA adapté aux chélates d'Europium

Le résultat est exprimé comme le rapport de signal spécifique sur le signal du plasmide non traité et est similaire au résultat montré sur la figure 1.

- 10 Il est ainsi montré, à ce stade de développement du test, un seuil de détection également de 30 J/m<sup>2</sup> pour les lésions UVC.

La technologie DELFIA a ainsi été adaptée avec succès au procédé selon l'invention.

15

20

25

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: GENOLIFE
- (B) RUE: BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE
- (C) VILLE: SAINT BEAUZIRE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 63390

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PROCEDE DE DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE D'ALTERATIONS DE L'ADN ET DES LIGANDS DE CES ALTERATIONS

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9706102
- (B) DATE DE DEPOT: 20-MAY-1997

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: MIS-C

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATGTGAATCA GTATGGTTCC TATCTGCTGA AGGAAAT

37

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: MIS-T

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATGTGAATCA GTATGGTTTC TATCTGCTGA AGGAAAT

37

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: MIS-Grev

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AATTCCCTCA GCAGATAGGA ACCATACTGA TTCACAT

37

## REVENDICATIONS

- 1) Procédé de mise en évidence d'une altération d'une séquence d'ADN, caractérisé en ce que :

5 a) on met ladite séquence d'ADN en présence d'une composition comportant au moins un composé reconnaissant le type d'altération en cause, dénommé ligand, dans un milieu assurant la reconnaissance,

b) on révèle la reconnaissance de l'altération par ledit ligand.

10 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ligand est une protéine de reconnaissance du système de réparation de l'ADN.

15 3) Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le milieu assurant la reconnaissance est constitué par un extrait cellulaire.

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le ligand est une protéine de reconnaissance du système NER.

15 5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le ligand est une protéine de reconnaissance du système BER.

6) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le ligand est une protéine de reconnaissance du système de réparation des mésappariements.

20 7) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le ligand est une protéine de reconnaissance du système détectant les cassures de l'ADN.

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le ligand est marqué.

25 9) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on utilise dans l'étape b) un élément de révélation de la reconnaissance du ligand.

10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'élément de révélation de la reconnaissance du ligand comporte un anticorps.

11) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'ADN utilisé dans l'étape a) est au moins partiellement purifié.

30 12) Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'ADN utilisé dans l'étape a) est un extrait cellulaire total.

13) Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'ADN de l'étape a) est fixé sur un support solide.

35 14) Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le procédé est mis en oeuvre en milieu liquide.

15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le système de révélation utilisé est le système TRACE.

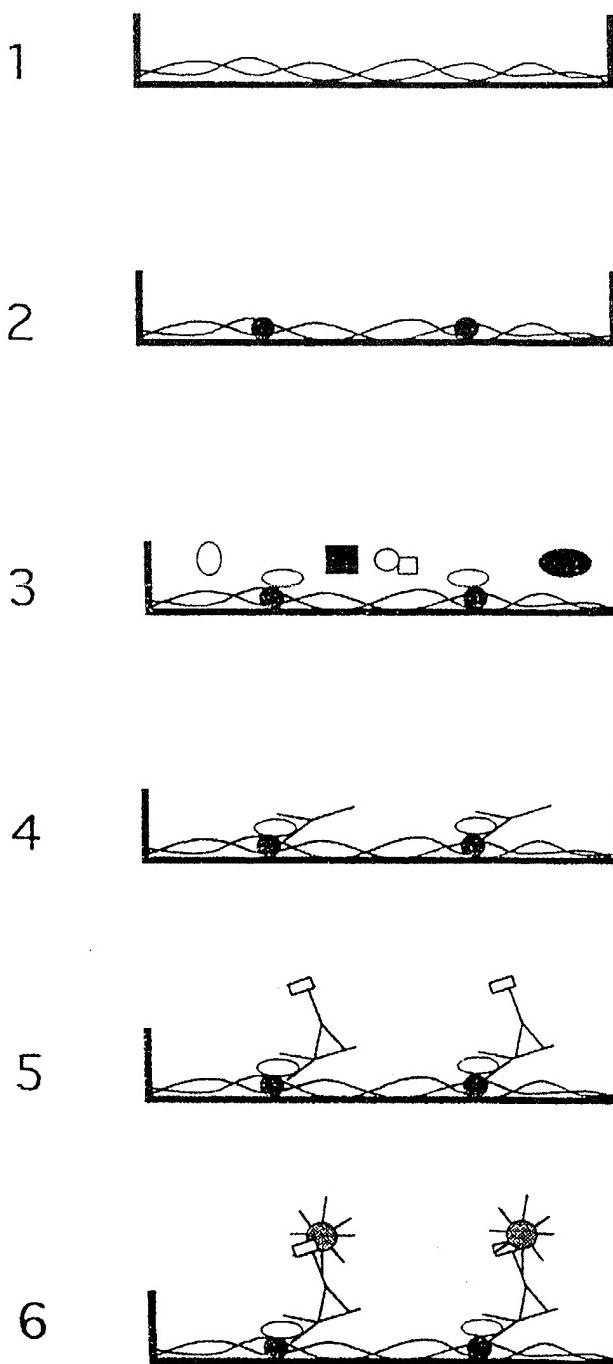
16) Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'étape a) comporte des composés reconnaissant différents types d'altération et en ce que dans l'étape b) on peut identifier séparément les différents types de reconnaissance.

17) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les composés reconnaissant les différents types d'altération sont révélés par des marqueurs différents.

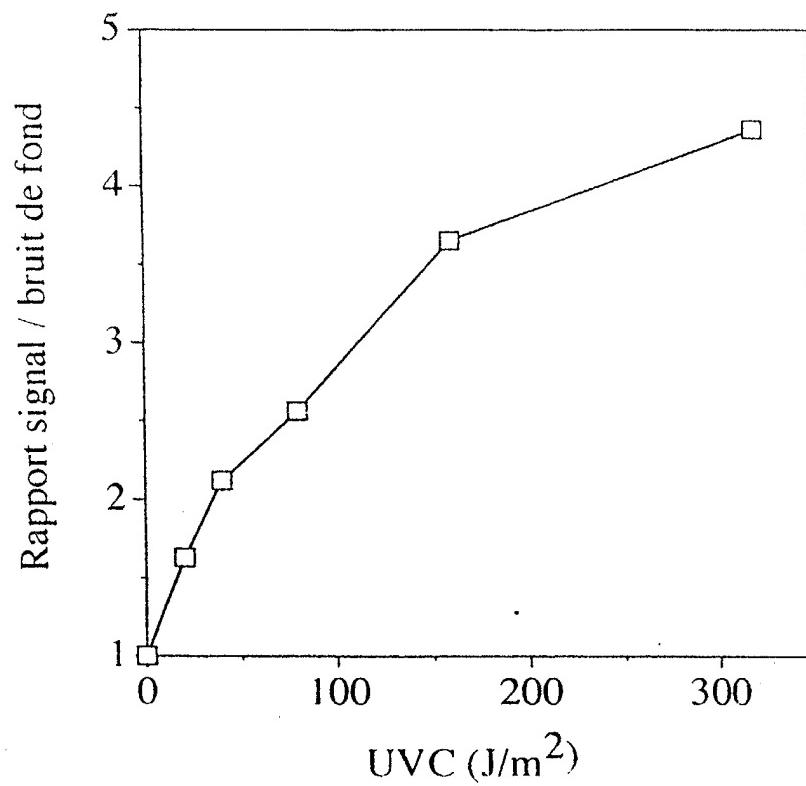
18) Procédé permettant la mise en évidence dans un échantillon d'une altération du système de réparation de l'ADN, caractérisé en ce que :

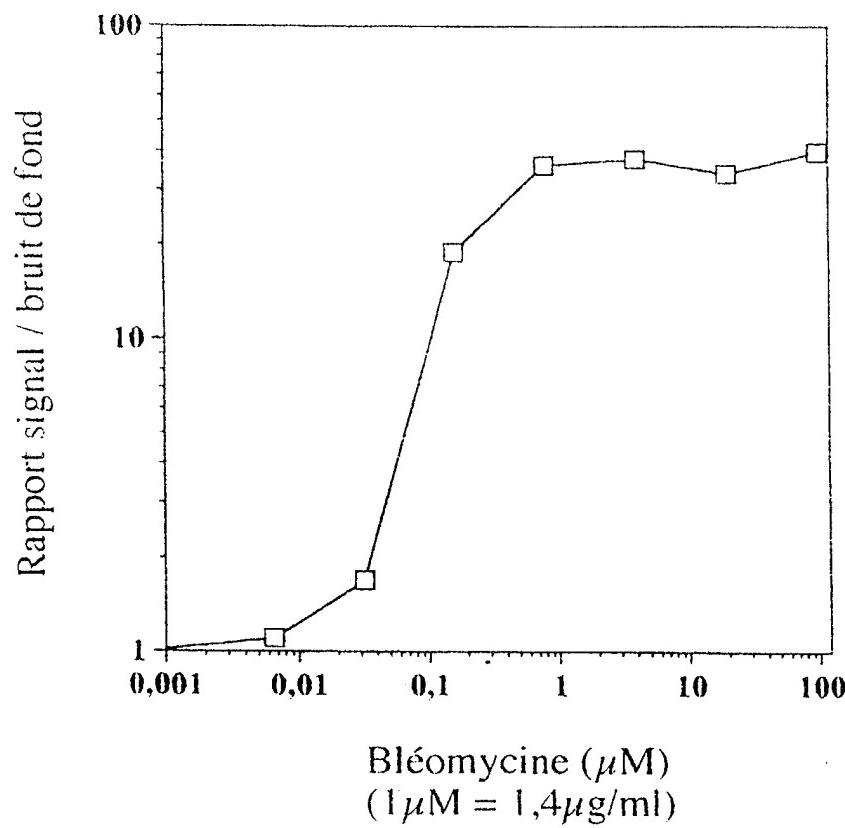
- 10 a) on met l'échantillon en présence d'un ADN altéré,
- b) on révèle la reconnaissance de l'altération par un ligand du système de réparation, on évalue le résultat obtenu à l'étape b) par rapport à un standard constitué par un échantillon normal traité dans les mêmes conditions.

19) Application du procédé selon l'une des revendications 1 à 18, à la mise 15 en évidence des propriétés génotoxiques d'un environnement par mesure de l'altération que l'environnement produit sur l'ADN de l'échantillon.



## FIGURE 1

**FIGURE 2**

**FIGURE 3**

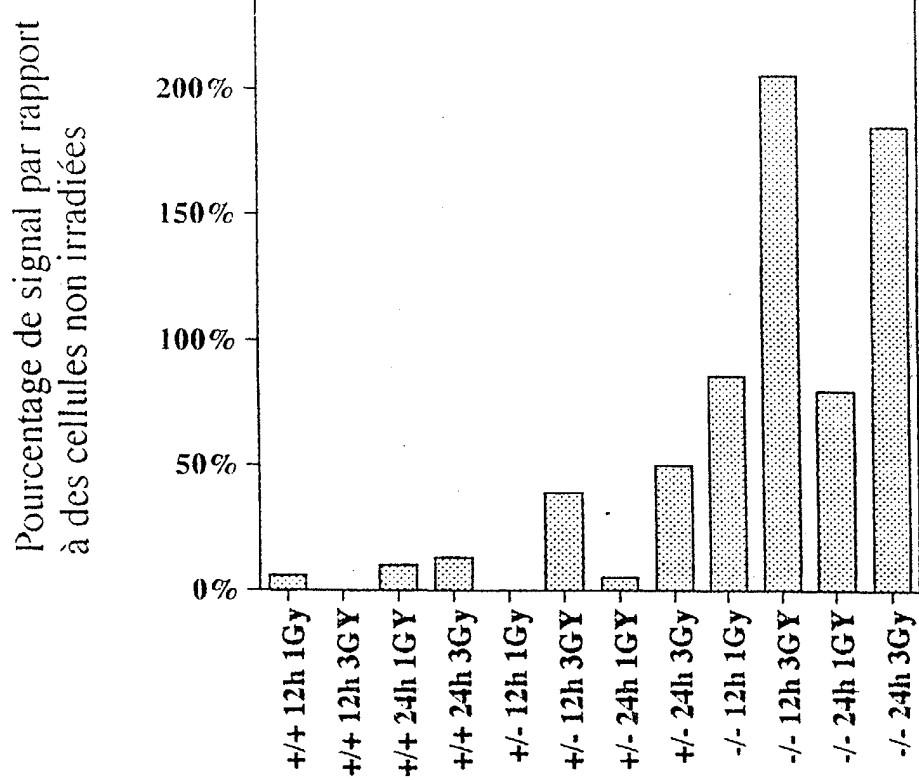


FIGURE 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on Application No

PCT/FR 98/01008

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No    |
|----------|--|-------------------------|
| X        | WO 96 28571 A (RECH INVESTISSEMENT SOC FR DE ; PROVOT CHRISTIAN (FR); SALLÉS BERNARD)<br>19 September 1996<br>cited in the application<br>see the whole document | 1-5,<br>8-14, 18,<br>19 |
| Y        | ---  | 6, 7, 16,<br>17         |
| X        | WO 96 24688 A (MOSAIC TECHNOLOGIES)<br>15 August 1996<br>cited in the application<br>see abstract  | 1, 3, 9,<br>10, 13      |
| Y        | see page 8, line 3 - line 9; claims 1-10<br>---  | 6, 7, 16,<br>17         |

Further documents are listed in the continuation of box C

Patent family members are listed in annex.

### Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

### Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

25 September 1998

08/10/1998

### Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                 |                |
|-----------------|----------------|
| Inte            | Application No |
| PCT/FR 98/01008 |                |

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.         |
|----------|--|-------------------------------|
| X        | SALLES B ET AL.: "A chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments"<br>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,<br>vol. 232, 1995, pages 37-42, XP002054956<br>see the whole document<br>---   | 1-8,<br>11-14,<br>18, 19      |
| X        | SALLES B ET AL.: "In vitro eukaryotic DNA excision repair assays; an overview"<br>BIOCHIMIE,<br>vol. 77, no. 10, 1995, pages 796-802,<br>XP002054957<br>cited in the application<br>see the whole document<br>---  | 1-5,<br>8-14, 18,<br>19       |
| X        | CALSOU P ET AL.: "Double strand breaks in DNA inhibit nucleotide excision"<br>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,<br>vol. 271, no. 44, 1996, pages 27601-27607,<br>XP002078683<br>see abstract<br>see page 27602, column 1, paragraph 5 -<br>column 2, paragraph 3<br>see page 27604, column 2, paragraph 2 -<br>page 27605, column 2, paragraph 1; figures<br>2,3,5<br>--- | 1-4, 7,<br>9-12, 14,<br>18    |
| Y        | CALSOU P ET SALLES B: "MEASUREMENT OF DAMAGE-SPECIFIC DNA INCISION BY NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN VITRO"<br>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,<br>vol. 202, no. 2, 29 July 1994, pages 788-795, XP002008620<br>cited in the application<br>see the whole document<br>---   | 1-7, 11,<br>12, 14,<br>18, 19 |
| Y        | WO 96 23895 A (UNIV TEXAS ; HOUTEN BENNETT VAN (US)) 8 August 1996<br>see the whole document<br>---  | 1-7, 11,<br>12, 14,<br>18, 19 |
| Y        | SALLES B AND CALSOU P: "Rapid quantification of DNA repair synthesis in cell extracts"<br>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,<br>vol. 215, 1993, pages 304-306, XP002054958<br>cited in the application<br>see the whole document<br>---  | 1-4, 11,<br>12, 14,<br>15, 18 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/FR 98/01008

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| Y        | CALSOU P ET SALLES B: "PROPERTIES OF DAMAGE-DEPENDENT DNA INCISION BY NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN HUMAN CELL-FREE EXTRACTS"<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 22, no. 23, 1994, pages 4937-4992,<br>XP002047715<br>cited in the application<br>see the whole document<br>----                             | 1-4,11,<br>12,14,18   |
| Y        | ZUBER E ET AL.: "A descriptive model for the kinetics of a homogeneous fluorometric immunoassay"<br>JOURNAL OF IMMUNOASSAY,<br>vol. 18, no. 1, 1997, pages 21-47,<br>XP002078684<br>see abstract<br>see page 22, paragraph 2 - page 25,<br>paragraph 2<br>----   | 1,15                  |
| A        | WOOD R D ET AL.: "Complementation of the Xeroderma Pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts"<br>CELL,<br>vol. 53, 1988, pages 97-106, XP002054959<br>cited in the application<br>see the whole document<br>----   |                       |
| A        | SIBGHAT-ULLAH ET AL.: "Human nucleotide excision repair in vitro: repair of pyrimidine dimers, psoralen and cisplatin adducts by HeLa cell-free extract"<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 17, no. 12, 1989, pages 4471-4484,<br>XP002054960<br>cited in the application<br>see the whole document<br>----- |                       |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

|        |                |
|--------|----------------|
| Inte   | application No |
| PCT/Fr | 98/01008       |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) |           |  | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|-----------|--|------------------|
| WO 9628571 A                           | 19-09-1996       | FR                      | 2731711 A |  | 20-09-1996       |
|  |                  | AU                      | 5008996 A |  | 02-10-1996       |
|  |                  | CA                      | 2215493 A |  | 19-09-1996       |
|  |                  | EP                      | 0815260 A |  | 07-01-1998       |
| WO 9624688 A                           | 15-08-1996       | AU                      | 4701396 A |  | 27-08-1996       |
| WO 9623895 A                           | 08-08-1996       | AU                      | 4967096 A |  | 21-08-1996       |
|  |                  | CA                      | 2220951 A |  | 08-08-1996       |
|  |                  | EP                      | 0815254 A |  | 07-01-1998       |

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Internationale No

PCT/FR 98/01008

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C1201/68 C12N15/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie | Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no des revendications visées |
|-----------|--|------------------------------|
| X         | WO 96 28571 A (RECH INVESTISSEMENT SOC FR DE ;PROVOT CHRISTIAN (FR); SALLES BERNARD) 19 septembre 1996 cité dans la demande voir le document en entier | 1-5, 8-14, 18, 19            |
| Y         | ---  | 6, 7, 16, 17                 |
| X         | WO 96 24688 A (MOSAIC TECHNOLOGIES) 15 août 1996 cité dans la demande voir abrégé  | 1, 3, 9, 10, 13              |
| Y         | voir page 8, ligne 3 - ligne 9; revendications 1-10<br>---   | 6, 7, 16, 17                 |
|           |  | -/-                          |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25 septembre 1998

08/10/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Europeen des Brevets, P. B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem  
Internationale No  
PCT/FR 98/01008

| C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |                               |
|--|--|-------------------------------|
| Catégorie                                      | Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no des revendications visées  |
| X  | SALLES B ET AL.: "A chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments"<br>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,<br>vol. 232, 1995, pages 37-42, XP002054956<br>voir le document en entier<br>---   | 1-8,<br>11-14,<br>18, 19      |
| X  | SALLES B ET AL.: "In vitro eukaryotic DNA excision repair assays; an overview"<br>BIOCHIMIE,<br>vol. 77, no. 10, 1995, pages 796-802,<br>XP002054957<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>---  | 1-5,<br>8-14, 18,<br>19       |
| X  | CALSOUP ET AL.: "Double strand breaks in DNA inhibit nucleotide excision"<br>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,<br>vol. 271, no. 44, 1996, pages 27601-27607,<br>XP002078683<br>voir abrégé<br>voir page 27602, colonne 1, alinéa 5 -<br>colonne 2, alinéa 3<br>voir page 27604, colonne 2, alinéa 2 -<br>page 27605, colonne 2, alinéa 1; figures<br>2,3,5<br>--- | 1-4, 7,<br>9-12, 14,<br>18    |
| Y  | CALSOUP ET SALLES B: "MEASUREMENT OF DAMAGE-SPECIFIC DNA INCISION BY NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN VITRO"<br>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,<br>vol. 202, no. 2, 29 juillet 1994, pages 788-795, XP002008620<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>---   | 1-7, 11,<br>12, 14,<br>18, 19 |
| Y  | WO 96 23895 A (UNIV TEXAS ;HOUTEN BENNETT VAN (US)) 8 août 1996<br>voir le document en entier<br>---   | 1-7, 11,<br>12, 14,<br>18, 19 |
| Y  | SALLES B AND CALSOUP P: "Rapid quantification of DNA repair synthesis in cell extracts"<br>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,<br>vol. 215, 1993, pages 304-306, XP002054958<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>---   | 1-4, 11,<br>12, 14,<br>15, 18 |
|  |  | -/-                           |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

e Internationale No

PCT/FR 98/01008

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| Y         | CALSOUP ET SALLES B: "PROPERTIES OF DAMAGE-DEPENDENT DNA INCISION BY NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN HUMAN CELL-FREE EXTRACTS"<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 22, no. 23, 1994, pages 4937-4992,<br>XP002047715<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>----                              | 1-4, 11,<br>12, 14, 18        |
| Y         | ZUBER E ET AL.: "A descriptive model for the kinetics of a homogeneous fluorometric immunoassay"<br>JOURNAL OF IMMUNOASSAY,<br>vol. 18, no. 1, 1997, pages 21-47,<br>XP002078684<br>voir abrégé<br>voir page 22, alinéa 2 - page 25, alinéa 2<br>----  | 1, 15                         |
| A         | WOOD R D ET AL.: "Complementation of the Xeroderma Pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts"<br>CELL,<br>vol. 53, 1988, pages 97-106, XP002054959<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>----   |                               |
| A         | SIBGHAT-ULLAH ET AL.: "Human nucleotide excision repair in vitro: repair of pyrimidine dimers, psoralen and cisplatin adducts by HeLa cell-free extract"<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 17, no. 12, 1989, pages 4471-4484,<br>XP002054960<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>----- |                               |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de la famille de brevets

|        |                   |
|--------|-------------------|
| Den    | Internationale No |
| PCT/FR | 98/01008          |

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)                      | Date de<br>publication                               |
|---|------------------------|--|--|
| WO 9628571 A                                    | 19-09-1996             | FR 2731711 A<br>AU 5008996 A<br>CA 2215493 A<br>EP 0815260 A | 20-09-1996<br>02-10-1996<br>19-09-1996<br>07-01-1998 |
| WO 9624688 A                                    | 15-08-1996             | AU 4701396 A   | 27-08-1996   |
| WO 9623895 A                                    | 08-08-1996             | AU 4967096 A<br>CA 2220951 A<br>EP 0815254 A                 | 21-08-1996<br>08-08-1996<br>07-01-1998               |